

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

CAMPUS BAIXADA SANTISTA

ROBSON LUIZ OLIVEIRA SANTOS

**EFEITOS DO ISOLAMENTO SOCIAL
CRÔNICO SOBRE PARÂMETROS
COMPORTAMENTAIS E METABÓLICOS EM
CAMUNDONGOS DE MEIA IDADE**

Santos

2019

ROBSON LUIZ OLIVEIRA SANTOS

**EFEITOS DO ISOLAMENTO SOCIAL
CRÔNICO SOBRE PARÂMETROS
COMPORTAMENTAIS E METABÓLICOS EM
CAMUNDONGOS DE MEIA IDADE**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal de São Paulo – Campus
Baixada Santista - como parte dos requisitos
curriculares para obtenção do título de bacharel em
Educação Física.

Orientadora: PROFA. DRA. CAMILA A. M. OLIVEIRA
Co-orientadora: MSc. IZABELLE DIAS BENFATO

Santos
2019

Ficha catalográfica elaborada por sistema automatizado
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

I64e Santos, Robson.
EFEITOS DO ISOLAMENTO SOCIAL CRÔNICO SOBRE
PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E METABÓLICOS EM
CAMUNDONGOS DE MEIA IDADE. / Robson Santos;
Orientadora CAMILA OLIVEIRA; Coorientadora Isabelle
Benfato. -- Santos, 2019.
28 p. ; 30cm

TCC (Graduação - Educação Física) -- Instituto Saúde
e Sociedade, Universidade Federal de São Paulo, 2019.

1. Isolamento Social. I. OLIVEIRA, CAMILA,
Orient. II. Benfato, Isabelle, Coorient. III. Título.

CDD 613.7

Bibliotecária Daianny Seoni de Oliveira - CRB 8/7469

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço aos meus pais que desde sempre foram o motivo de tudo. Desde sempre possibilitaram tudo. Desde sempre me deram tudo. É por vocês e para vocês;

Agradeço à todas integrantes do meu grupo de pesquisa. O tempo com vocês foi extremamente enriquecedor para minha formação profissional e pessoal. O desenvolvimento desse trabalho não seria possível sem vocês;

Agradeço aos meus amigos por todo o amor, suporte e companheirismo do primeiro dia da graduação até os dias de hoje. Vocês fazem a diferença;

Agradeço à Banca Examinadora pela rica contribuição feita ao trabalho;

Agradeço à todos funcionários da Unifesp – Campus Baixada Santista pelos serviços prestados;

Agradeço à todos que contribuíram direta e indiretamente com este trabalho.

Por fim, agradeço ao PIBIC/CNPq e FAPESP (processos 2011/05932-3; 2017/04528-0) pelo fomento financeiro da pesquisa e por ainda possibilitarem esse tipo de trabalho no país.

RESUMO

O isolamento social está associado à redução da qualidade de vida e aumento da mortalidade, e embora possa ocorrer em qualquer faixa etária, ele se torna mais comum com o avanço da idade. Informações relevantes acerca das consequências da restrição social sobre parâmetros que afetam diretamente a qualidade de vida e que podem ter repercussões metabólicas são de extrema importância, visto que a nossa população apresenta este tipo de comportamento cada vez mais precocemente. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do isolamento social crônico do início da vida adulta até a meia idade em parâmetros da locomoção (atividade física espontânea, distância percorrida e velocidade média de locomoção); parâmetros comportamentais (memória de curto prazo e comportamento do tipo ansioso) e parâmetros metabólicos relacionados à homeostase glicêmica em camundongos mantidos em diferentes tipos de alojamento (coletivo ou individual, compondo os grupos Social e Isolado, respectivamente). Para isso, os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (n=10) ou individuais (n=10) dos 4 aos 10 meses de vida. Foram avaliados ao fim do período experimental: a memória de curto prazo (utilizando o teste de reconhecimento de objetos); o comportamento do tipo ansioso (utilizando o teste labirinto em cruz elevado); a glicemia de jejum e a sensibilidade à insulina (verificada pelo teste intraperitoneal de tolerância à insulina); a ingestão alimentar e os parâmetros da locomoção (atividade física espontânea, distância percorrida e a velocidade média em um ciclo de 24h). Também foi verificado o ganho de peso dos animais ao longo de todo o experimento. Para a análise estatística, foram usados os testes t-student não pareado e ANOVA two way e o valor de significância adotado foi $p < 0,05$. Em relação aos parâmetros do metabolismo, não observamos diferenças significativas entre a ingestão alimentar, glicemia de jejum e sensibilidade à insulina. Porém foi observada uma tendência ($p = 0,055$) ao maior ganho de peso nos animais isolados. Em relação ao comportamento do tipo ansioso, não observamos diferenças entre os grupos. Já na memória de curto prazo, observamos que o grupo Social passou maior porcentagem do tempo explorando o objeto novo do que o objeto familiar, ao passo que o grupo Isolado explorou os dois objetos por tempo semelhante, indicando prejuízo da memória de curto prazo. Na locomoção, não observamos diferenças da atividade física espontânea em relação ao tipo de alojamento. Contudo, em relação a velocidade média e a distância percorrida, observamos um significativo aumento nos animais do grupo Isolado. Com base no exposto, concluímos que o tipo de alojamento não alterou negativamente os parâmetros metabólicos avaliados e nem os parâmetros da atividade. Entretanto, o isolamento social crônico resultou em prejuízo da memória de curto prazo, sem afetar, contudo, o comportamento do tipo ansioso dos animais. Todos os procedimentos desenvolvidos nesse trabalho foram aprovados pelo comitê de ética da universidade (CEUA 5541040218).

Palavras-chave: Isolamento social. Envelhecimento. Comportamento. Homeostase glicêmica. Atividade física.

ABSTRACT

Social isolation is associated with reduced quality of life and increased mortality, and although it can occur at any age, it becomes more common with advancing age. Relevant information about the consequences of social restriction on parameters that directly affect quality of life and which may have important metabolic repercussions is of utmost importance, as our population presents this type of behavior ever earlier. Thus, the aim of the present study was to evaluate the effects of chronic social isolation from early adulthood to middle age on locomotion parameters (spontaneous physical activity, distance traveled and mean locomotion velocity); behavioral parameters (short-term memory and anxious behavior) and metabolic parameters related to glycemic homeostasis in mice kept in different types of housing (collective or individual). For this, the animals were kept in collective (n = 10) or individual (n = 10) cages from 4 to 10 months of age. The following were evaluated at the end of the experimental period: short-term memory (using the object recognition test); anxious-type behavior (using the elevated cross maze test); fasting blood glucose and insulin sensitivity (verified by intraperitoneal insulin tolerance test); food intake and locomotion parameters (spontaneous physical activity, distance covered and average speed in a 24h cycle). We also verified the weight gain of the animals throughout the experiment. For the statistical analysis, the unpaired t-student and two way ANOVA tests were used and the significance value adopted was $p < 0.05$. Regarding metabolism parameters, we did not observe significant differences between groups for food intake, fasting glucose and insulin sensitivity. However, a tendency ($p = 0.055$) to increased weight gain was observed in the isolated animals. Regarding anxious behavior, we did not observe differences between groups. In short-term memory, we observed that the Social group spent more time exploring the new object than the familiar object, while the Isolated group explored both objects for similar time, indicating impairment of short-term memory. In locomotion, we did not observe differences in spontaneous physical activity in relation to the type of housing. However, in relation to the average speed and distance traveled, we observed a significant increase in the animals of the isolated group. Based on the above, we concluded that the type of housing did not negatively alter the evaluated metabolic parameters nor the activity parameters. However, chronic social isolation resulted in impaired short-term memory, without affecting, however, anxious animal behavior. All procedures developed in this work were approved by the University Ethics Committee (CEUA 5541040218).

Key words: Social isolation. Aging. Behavior. Glycemic homeostasis. Physical activity.

Lista de abreviaturas e siglas

AFE – Atividade Física Espontânea

AUC – Área Abaixo da Curva Glicêmica

CEDEME – Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais Para Biologia e Medicina

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

IL-1B – Interleucina - 1B

IL-6 – Interleucina - 6

ipITT – Teste Intraperitoneal de Tolerância à Insulina

LaDESC – Laboratório de Diabetes Experimental e Sinalização Celular

RO – Reconhecimento de Objetos

TNF-alfa – Fator de Necrose Tumoral Alfa

UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. MATERIAS E MÉTODOS.....	12
2.1 Animais.....	12
2.2 Avaliação dos parâmetros metabólicos dos animais.....	12
2.2.1 Avaliação da ingestão alimentar e ganho de peso.....	12
2.2.2 Glicemia de jejum e teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT).....	12
2.3 Avaliação dos parâmetros comportamentais.....	13
2.3.1 Teste reconhecimento de objetos.....	13
2.3.2 Teste labirinto em cruz elevada.....	13
2.4 Avaliação dos parâmetros locomotores.....	13
2.4.1 Atividade física espontânea, distância total percorrida e velocidade média.....	13
2.5 Análise estatística.....	14
3. RESULTADOS.....	15
4. DISCUSSÃO.....	19
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	21
8. REFERÊNCIAS.....	23
9. ANEXOS.....	26

1. INTRODUÇÃO

As relações sociais são centrais para nosso bem-estar e estão diretamente envolvidas na manutenção da saúde. É amplamente conhecido que o isolamento social, definido por meio de critérios como ter poucos contatos, pouco envolvimento em atividades sociais e morar sozinho, é associado com prejuízo na qualidade de vida e aumento da mortalidade (STEPTOE *et al.*, 2013). O isolamento social pode ocorrer em qualquer etapa da vida, e quando ocorre na infância, tem efeitos negativos persistentes e cumulativos na saúde na vida adulta (CASPI *et al.*, 2006). Contudo, o isolamento é mais comum em idades mais avançadas, quando a diminuição dos recursos econômicos, a deficiência de mobilidade e a morte de contemporâneos limitam os contatos sociais (ILIFFE *et al.*, 2007; CORNWELL, B.; LAUMANN, E. O.; SCHUMM, L.P., 2008).

No Brasil, um número cada vez maior de pessoas está vivendo sozinha, o que torna essas pessoas mais prováveis de vivenciarem o isolamento social. De acordo com dados da Síntese de Indicadores Sociais do IBGE (2016), o número de pessoas morando sozinhas aumentou mais de 40% nos últimos 10 anos, tendo relação com o envelhecimento populacional. Assim sendo, numa análise subjetiva acerca do quadro, é de extrema importância um trabalho que edifique informações sobre os efeitos da combinação isolamento social e envelhecimento sobre parâmetros metabólicos e comportamentais.

O isolamento social está associado a alterações negativas em uma série de comportamentos relacionados à saúde (SHANKAR *et al.*, 2011; KOBAYASHI e STEPTOE, 2018). Em indivíduos com 50 anos de idade ou mais, o isolamento social foi associado com maior probabilidade de ser fisicamente inativo, com o tabagismo (Shankar *et al.*, 2011), e com menor probabilidade de consumo de frutas e vegetais e de participação em atividades físicas de intensidade moderada e elevada (KOBAYASHI e STEPTOE, 2018). Em linha com essas alterações comportamentais, as pessoas socialmente isoladas apresentaram níveis elevados de pressão arterial, proteína C-reativa e fibrinogênio (SHANKAR *et al.*, 2011).

O isolamento social também tem sido associado à deterioração cognitiva (Bassuk *et al.*, 1999), risco aumentado de transtorno depressivo maior, fobia social e transtorno de ansiedade generalizada (CHOU, K.L.; LIANG, K.; SAREEN, J., 2011). Outras alterações desencadeadas pela vida socialmente limitada estão relacionadas diretamente a função do sistema nervoso central. Indivíduos mais velhos e que têm

menor integração social demonstram declínio acelerado da memória em relação àqueles com alta integração social, além de menor desempenho em tarefas de recordação e fluência verbal (WHITE, C. N.; VANDERDRIFT, L. E.; HEFFERNAN, K. S., 2015).

Pesquisas com modelos animais tem nos ajudado a compreender melhor os impactos do isolamento social. Kamal *et al.* (2014), demonstraram em um estudo com camundongos C57bl/6J com idades entre 4 e 6 meses que setenta e duas horas de isolamento já são suficientes para reduzir a potenciação de longa duração no hipotálamo. Esses animais apresentavam níveis elevados de corticosterona, e o uso de antagonista de receptor de glicocorticoide reverteu esse efeito. Em consonância com esses resultados, Võikar *et al.* (2005), observaram prejuízo da memória em camundongos C57bl/6J mantidos em gaiolas individuais por 7 semanas, conforme demonstrado pelo menor índice de discriminação durante teste de reconhecimento de objetos.

As consequências do isolamento social em modelos animais sobre a homeostase energética e metabólica parecem ser linhagem e tempo-dependentes. Nonogaki, K.; Nozue, K.; Oka, Y. (2007), observaram que camundongos KK, mas não C57bl/6J, com 8 semanas de idade tiveram maior ganho de peso, maior adiposidade e desenvolveram diabetes mellitus após 3 semanas de isolamento. Nesse estudo a obesidade ocorreu inicialmente por redução do gasto energético, seguida por aumento do consumo alimentar.

Por outro lado, Võikar *et al.* (2005), mostraram que camundongos C57bl/6J submetidos ao isolamento social por 7 semanas ganharam menos peso que os camundongos alojados em grupo. Ao avaliar a atividade espontânea, foi observado que o grupo submetido ao isolamento social era mais ativo que o grupo alojado em gaiolas coletivas (VÕIKAR *et al.*, 2005). Contudo, o protocolo de avaliação de atividade física espontânea utilizado por esses autores teve duração de apenas 10 minutos, podendo não refletir o que acontece ao longo de um período de 24 horas. Tal determinação permitiria analisar separadamente os ciclos claro e escuro, sendo esse último o de maior atividade dos roedores.

A atividade física espontânea, para humanos, abrange atividades como caminhar, subir escadas, organização da casa, entre outras formas de atividade física que de forma geral são de baixa intensidade. Para os roedores, ela corresponde a toda movimentação na gaiola. O exercício físico feito de maneira proposital e sistemática, como o treinamento esportivo e atividades em academia, não se enquadram no conceito

de AFE, e são chamados de exercício voluntário (VILLABLANCA *et al.*, 2015). A compreensão dos impactos do isolamento social crônico sobre a atividade física espontânea (AFE) em fases mais tardias da vida é de grande importância. A AFE é inversamente relacionada aos níveis de interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em mulheres de 40 a 70 anos (WU *et al.*, 2014). Além disso, a AFE está associada com a melhora da sensibilidade à insulina, diminuição da circunferência da cintura e melhora do perfil lipídico em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 (HAMASAKI *et al.*, 2013).

A redução da AFE implica em maior período de tempo em comportamento sedentário que em humanos inclui sentar-se durante a locomoção, no local de trabalho, em ambientes domésticos e no tempo de lazer, ou seja, é um comportamento cujo gasto energético é muito baixo (OWEN *et al.*, 2010). Estudos recentes têm demonstrado que existe uma correlação positiva entre esse tipo de comportamento e mortalidade (Stamatakis *et al.*, 2013), além de problemas metabólicos e diversos tipos de câncer (KERR, J.; ANDERSON, C.; LIPPMAN, S. M., 2017).

À partir do exposto acima, fica evidente que o estudo da atividade física e do comportamento sedentário é de grande importância tanto para educação física quanto para uma melhor intervenção relacionada a promoção em saúde, sobretudo em grupos de pessoas isoladas socialmente, uma vez que o isolamento social está associado com níveis reduzidos de atividade física (SHANKAR *et al.*, 2011; KOBAYASHI e STEPTOE, 2018). Além disso, é importante levarmos em conta o envelhecimento da população, uma vez que o envelhecimento está associado tanto ao isolamento social (Iliffe *et al.*, 2007; Cornwell, B.; Laumann, E. O.; Schumm, L. P., 2008), quanto a menores níveis de atividade física (CASPERSEN *et al.*, 2000).

Recentemente, fizemos uso de um modelo experimental para investigar a regulação central da AFE em camundongos C57bl/6 durante o envelhecimento (dos 4 aos 10 meses de idade). Mostramos nesse trabalho que houve uma redução progressiva tanto da quantidade quanto da intensidade da atividade física espontânea à partir dos 6 meses de idade. Aos 10 meses (equivalente à meia-idade em camundongos) a AFE foi em média 30% menor do que aos 4 meses. Além da redução da AFE, os camundongos apresentaram também intolerância à glicose (BENFATO *et al.*, 2017).

Toda via, além dos pontos supracitados, existe a motivação pessoal do autor em buscar preencher lacunas em relação ao isolamento social uma vez que já foi

detentor deste tipo de comportamento e hoje encontra a oportunidade de melhor investigá-lo.

Assim, levando em consideração os diversos efeitos negativos do isolamento social, que podem ser persistentes e cumulativos, e que alterações importantes relacionadas ao envelhecimento começam em fases anteriores da vida (Michalakis *et al.*, 2013), a problemática do estudo consiste em: Quais os efeitos do isolamento social crônico com início na fase adulta sobre parâmetros relacionados a qualidade de vida (memória de curto prazo, comportamento do tipo ansioso, atividade física) e a homeostase glicêmica em camundongos com meia-idade?

Nesse sentido, o objetivo do estudo é: Avaliar os efeitos do isolamento social crônico com início na fase adulta sobre parâmetros relacionados à qualidade de vida (memória de curto prazo, comportamento do tipo ansioso, atividade física) e a homeostase glicêmica em camundongos com meia-idade.

À partir do exposto, as hipóteses de nosso estudo eram que o isolamento social crônico causasse, em camundongos de meia idade:

1. Prejuízo na memória de curto prazo, avaliada pelo teste de reconhecimento de objetos;
2. Aumento de comportamento relacionado à ansiedade;
3. Redução da atividade física espontânea, da velocidade média de locomoção e aumento do tempo de inatividade;
4. Prejuízos metabólicos importantes relacionados à intolerância à glicose e sensibilidade à insulina.

2. MATERIAS E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados 20 camundongos C57bl/6 machos com 3 meses de idade, provenientes do Biotério Central da Unifesp (CEDEME). Os animais foram mantidos no biotério setorial do Departamento de Biociências da Unifesp – Baixada Santista, com ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura de 22 ± 2 °C e livre acesso a água e à ração. Todos os procedimentos apresentados nessa proposta foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade (CEUA 5541040218). Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

A) Grupo Social: Camundongos alojados em gaiolas coletivas com livre acesso a água e a ração por todo o período experimental (4 aos 10 meses de idade); n= 10 animais.

B) Grupo Isolado: Camundongos alojados em gaiolas individuais com livre acesso a água e a ração por todo período experimental (4 aos 10 meses de idade); n= 10 animais.

2.2 Avaliação dos parâmetros metabólicos dos animais

2.2.1 Avaliação da ingestão alimentar e ganho de peso

O peso corporal e a ingestão alimentar foram registrados mensalmente durante todo o experimento. O consumo médio diário foi determinado pela subtração do peso do alimento remanescente na gaiola menos o peso do alimento ofertado 48h antes, e dividindo-se esse valor por 2 (para estipular o consumo em 24h).

2.2.2 Glicemia de jejum e teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT)

Como parte das análises para caracterização metabólica dos camundongos, a glicemia de jejum e a sensibilidade à insulina foram avaliadas ao final do estudo. Para que todos os animais tivessem o mesmo tempo de jejum, a ração foi retirada na noite anterior ao teste e ofertada na manhã seguinte (dia do teste) por 1 hora. Após esse período, a ração foi novamente retirada para que fosse dado início do jejum pré-teste (jejum de 5-6 horas). Após o jejum, foi verificada a glicemia de jejum usando o aparelho Accu-Check Performa. Posteriormente, foi administrada na cavidade peritoneal 0,5U/kg de peso corpóreo de insulina regular humana. A glicemia foi então verificada nos tempos 4, 8, 12 e 16 minutos. A AUC de glicose sanguínea (AUC =

mg/dL x 16 min) durante o ipITT foi calculada pelo método trapezoidal (MATTHEWS *et al.*, 1990).

2.3 Avaliação dos parâmetros comportamentais

2.3.1 Teste reconhecimento de objetos

O teste de reconhecimento de objetos foi realizado em um campo aberto circular de madeira (diâmetro = 50cm, altura = 40cm) sem o teto. No dia anterior ao teste, os animais passaram por uma aclimação individual de 5 minutos no mesmo aparato de teste. No dia seguinte os animais foram expostos ao teste com mesma duração agora na presença dos objetos. Ao longo das repetições das sessões, foram utilizados objetos diferentes, cada um com duas cópias, sendo do mesmo material diferindo quanto à cor, tamanho e forma. Os objetos foram pesados o suficiente para não serem deslocados pelos animais. Após cada série os objetos utilizados e o aparato assim como no campo aberto foram limpos com álcool 5%. Os animais foram expostos a dois objetos iguais na fase de treino e após um intervalo de retenção (1h) foram apresentados a um objeto familiar e a um objeto novo caracterizando a fase de teste. Os objetos utilizados na fase de treino e teste foram diferentes entre os animais. A duração das sessões foi de 5 minutos cada. As filmagens foram analisadas no programa de rastreamento AnyMaze® e identificado o tempo de exploração (em %) no objeto novo e no objeto familiar de cada animal.

2.3.2 Teste labirinto em cruz elevada

O labirinto em cruz elevado foi realizado em um aparato de madeira com formato de cruz que contém dois braços fechados (27,5 cm x 6,5 cm x 18 cm) em oposição a dois braços abertos (27,5 cm x 6,5 cm). Foi utilizada uma fita branca no fundo do aparato para aumentar o contraste e favorecer o reconhecimento do animal pelo programa de rastreamento (AnyMaze®). Os animais foram colocados no centro do labirinto e filmados por 5 minutos. A avaliação comportamental incluiu o tempo de permanência (em %) e o número de entradas nos braços abertos e fechados.

2.4 Avaliação dos parâmetros locomotores

2.4.1 Atividade física espontânea, distância total percorrida e velocidade média

Para medir a AFE utilizamos um sistema à base de sensores infravermelhos (*Harvard Apparatus*) em estrutura semelhante a uma moldura que envolve uma gaiola

de acrílico. Dois dos lados dessa moldura possuem 16 emissores de raios infravermelhos cada, separados uns dos outros por 1.3 cm, e os dois lados opostos que detectam esses raios para analisar a AFE nos eixos x e y. Foram feitas as determinações da AFE (soma dos movimentos estereotipados, definidos como o número de contagens em que a posição do camundongo é diferente da sua posição na coleta anterior mas igual a sua posição duas coletas atrás; e da locomoção, que consiste no número de contagens em que a posição do animal é diferente na penúltima e última coleta de dados), a distância percorrida e a velocidade média de locomoção. A AFE e os outros parâmetros da atividade (distância e velocidade média) foram registrados individualmente (inclusive no grupo Social) ao final do estudo, por 48 horas consecutivas, sendo apresentados em forma das contagens em 24 horas (um ciclo claro completo e um ciclo escuro completo).

2.5 Análise estatística

Os resultados foram inicialmente avaliados quanto à normalidade para determinação da análise estatística mais adequada, a ser realizada com o software SPSS (IBM®) versão 20. Os resultados serão apresentados em média \pm intervalo de confiança de 95%. Para análise estatística, foi utilizado o teste t-student e ANOVA *two-way*. Para as representações gráficas, foi usado o software GraphPad Prisma versão 5. O nível de significância adotado foi de $p \geq 0,05$.

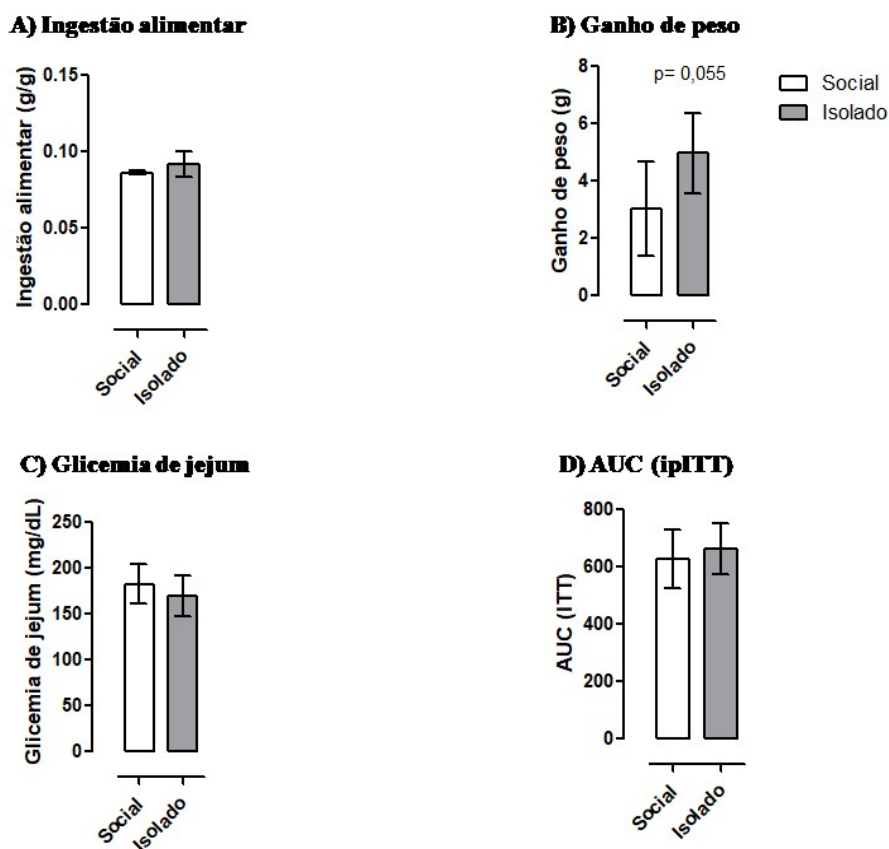
3. RESULTADOS

Primeiramente serão apresentados os dados metabólicos dos animais, submetidos ao isolamento social no período dos 4 aos 10 meses. Foram analisados tais parâmetros para acompanhamento das alterações metabólicas decorrentes desse modelo experimental. Nas figuras a seguir, o grupo Isolado (coluna branca) corresponde aos animais mantidos em gaiolas individuais e o grupo Social (coluna cinza) representa os animais mantidos em gaiolas coletivas.

Na **figura 1A** mostramos a ingestão alimentar (grama de ração/grama peso corporal) do grupo social e do grupo isolamento ao final do período do experimento. Semanalmente, a ração foi pesada numa balança semianalítica e ofertada aos animais. Podemos observar que não houve diferença estatística entre os dois grupos (Social = $0,08 \pm [0,08 - 0,087]$; Isolado = $0,09 \pm [0,08 - 0,09]$ g de ração/g peso corporal).

A **figura 1B** mostra o ganho de peso dos animais ao fim do delineamento experimental, onde observamos uma tendência ao aumento do ganho de peso no grupo isolamento em relação ao grupo social (Social = $3,03 \pm [1,39 - 4,66]$; Isolado = $4,98 \pm [3,58 - 6,37]$ g; $p = 0,055$). Não observamos diferenças entre os grupos na glicemia de jejum (Social = $182,5 \pm [161,2 - 203,8]$; Isolado = $169,5 \pm [146,9 - 192,1]$ mg/dL) (**figura 1C**) e na sensibilidade à insulina durante o ipITT (Social = $627,8 \pm [523,9 - 731,6]$; Isolado = $662,2 \pm [573,0 - 751,3]$)(**figura 1D**).

Figura 1 – Parâmetros Metabólicos



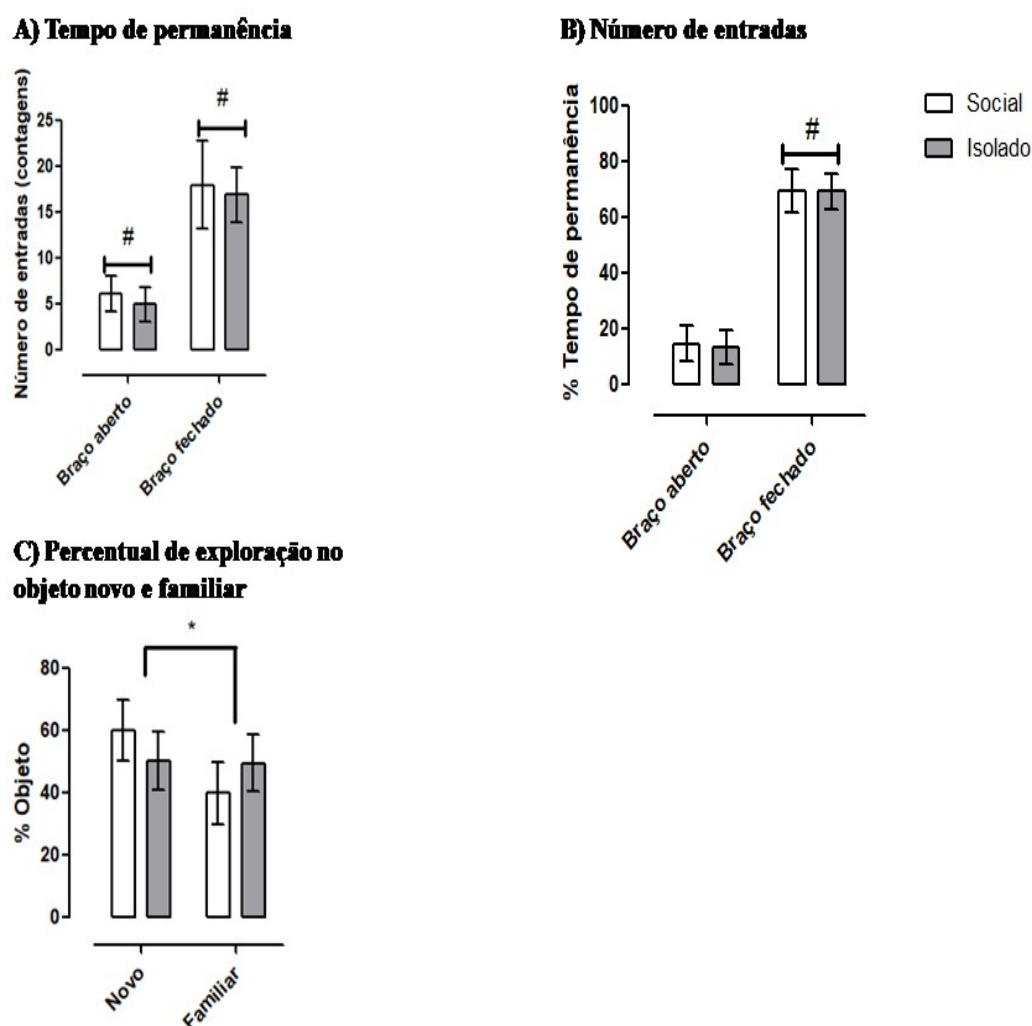
Avaliação da ingestão alimentar (A), ganho de peso (B), glicemia de jejum (C) e área abaixo da curva (AUC) glicêmica (D) do teste de sensibilidade à insulina (ipITT) em animais submetidos ou não ao isolamento social.

Test *t-student* não pareado, média \pm intervalo de confiança de 95%, $n=10$ /grupo. Nível de significância adotado $p<0,05$.

Em relação ao teste do labirinto em cruz elevado, não observamos diferenças em função do tipo de alojamento na porcentagem do tempo de permanência (**figura 2A**) no braço fechado (Social = $69,68 \pm [61,83 - 77,53]$; Isolado = $69,27 \pm [62,73 - 75,82]$ %) ou no braço aberto (Social = $14,75 \pm [8,42 - 21,07]$; Isolado = $13,29 \pm [7,19 - 19,38]$). Também não foram observadas diferenças em relação ao número de entrada (**figura 2B**) dos animais nos braços fechados (Social = $18,00 \pm [13,15 - 22,85]$; Isolado = $16,90 \pm [13,91 - 19,89]$ e no respectivo número de entrada nos braços abertos (Social = $6,10 \pm [4,12 - 8,07]$; Isolado = $5,00 \pm [3,12 - 6,87]$), demonstrando que o isolamento social não acarretou em comportamentos do tipo ansiogênicos. Em relação à memória de curto prazo, na (**figura 2C**) apresentamos o tempo de exploração, como porcentagem do tempo, do objeto novo e familiar no teste reconhecimento de objetos. Observamos que o grupo Social passou maior porcentagem do tempo explorando o

objeto novo, enquanto no grupo Isolado não houve essa diferenciação, o que indica que não houve discriminação entre objeto novo e familiar pelos animais desse grupo, sendo um indicativo de déficit da memória de curto prazo (Social: Objeto novo $60,05 \pm [50,09 - 70,01]^* \%$; Objeto familiar $39,95 \pm [29,99 - 49,91] \%$; Isolado Objeto novo $50,38 \pm [41,12 - 59,65 \%]$ / Objeto familiar $49,62 \pm [40,35 - 58,88] \%$, $p = 0,02$).

Figura 2 – Parâmetros Comportamentais



Avaliação do tempo de permanência em cada braço no teste labirinto em cruz elevada (A), número de entradas (B) e percentual de exploração no objeto no teste de reconhecimento de objetos (C) em animais submetidos ou não ao isolamento social.

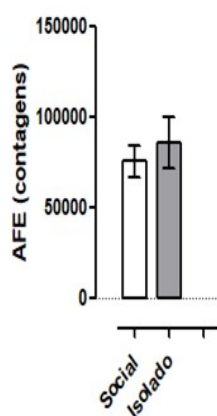
Two-way ANOVA, média \pm intervalo de confiança de 95%, $n=10$ /grupo. * = diferença em relação ao objeto novo, # = diferença em relação ao braço aberto. Nível de significância adotado $p<0,05$.

Os dados referentes à atividade física dos animais também foram coletados ao final do período experimental. Os resultados foram analisados para definição das alterações locomotoras dos animais submetidos ou não ao isolamento social. A **figura**

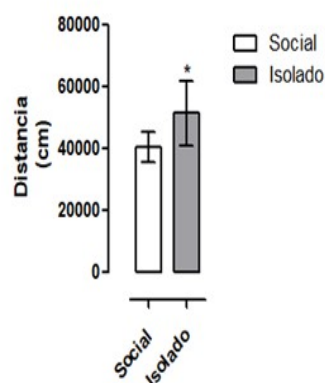
3A mostra a atividade física espontânea entre os grupos, onde não observamos diferenças (Social = $75580 \pm [66840 - 84320]$; Isolado = $85930 \pm [71580 - 100300]$ contagens). Em relação à distância total percorrida representada pela **figura 3B** (Social = $40550 \pm [35720 - 45380]$; Isolado = $51450 \pm [41110 - 61800]$ cm; $p = 0,04$) e a velocidade média apresentada na **figura 3C** (Social = $0,47 \pm [0,41 - 0,52]$; Isolado = $0,59 \pm [0,47 - 0,71]$ cm/s; $p=0,04$), observamos um aumento significativo destas variáveis no grupo isolado.

Figura 3 – Parâmetros Locomotores

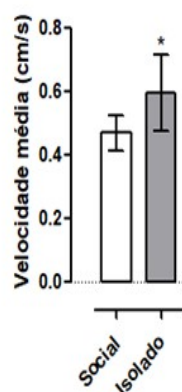
A) Atividade física espontânea



B) Distância percorrida



C) Velocidade média



Avaliação da atividade física espontânea (A), distância total percorrida (B) e velocidade média (C) dos animais submetidos ou não ao isolamento social.

Test *t-student* não pareado, média \pm intervalo de confiança de 95%, $n=10$ /grupo. * = diferença em relação ao grupo social. Nível de significância adotado $p < 0,05$.

4. DISCUSSÃO

O isolamento social era considerado um problema ligado à cultura nipônica (*Japanese culture-bound syndrome*), porém, nos últimos anos, têm sido descritos casos de isolamento em diversos outros países como Austrália, Índia, Espanha, Canadá, EUA, França, Itália e Brasil (DOMINGUES-CASTRO E TORRES, 2018). Cerca de 10% das pessoas com 65 anos ou mais parecem ser socialmente isoladas quando uma medida objetiva de interação social é usada, enquanto cerca de 12% expressam insatisfação com seus contatos sociais, levando à solidão e isolamento emocional (ILIFFE *et al.*, 2007).

Caspi *et al.* (2006), conduziram uma pesquisa longitudinal com crianças de ambos os sexos desde o nascimento acompanhando-as até a idade adulta quando fizessem 26 anos e conseguiram concluir que o isolamento social é um fator de risco tanto psicossocial quanto para a saúde física.

No contexto experimental, é importante haver a distinção entre isolamento verdadeiro e alojamento individual. Na última situação, os camundongos não são desprovidos de receber informações sensoriais de outros camundongos no biotério por meio do olfato, audição e visão e, de fato, na maioria dos estudos, esse é o modelo utilizado. No entanto, não há consenso completo sobre o que significa alojamento individual para um camundongo (VÕIKAR *et al.*, 2005).

No presente estudo, buscamos entender o impacto do isolamento social em camundongos dos 4 aos 10 meses, representando um curso de vida da idade adulta até a meia-idade sobre parâmetros metabólicos, comportamentais e locomotores desses animais. No trabalho desenvolvido por Võikar *et al.* (2005), foi identificado que camundongos isolados podem apresentar respostas diferentes ao isolamento dependendo de sua linhagem. O teste de reconhecimento de objetos foi desenvolvido num protocolo de 24h de intervalo entre a sessão treino e a sessão teste e então constatado déficit de memória nos camundongos isolados quando comparados ao grupo social. Ainda que tenhamos trabalhado com animais envelhecidos e isolados de uma só linhagem (C57bl/6) e com o protocolo de 1h de intervalo entre a sessão treino e a sessão teste, o mesmo resultado foi identificado. Esse dado abre espaço para novos trabalhos relacionando o isolamento social a áreas do cérebro correspondentes à memória e ao comportamento em modelos experimentais de envelhecimento. Azevedo e Afonso (2016), afirmam que os sentimentos de solidão que atingem os idosos não são apenas

características dos que se encontram institucionalizados. Sua prevalência aumenta, sobretudo, quando surgem acontecimentos de vida que se traduzem em perdas ou, quando sua capacidade de adaptação está diminuída.

Para Soares (2006), o cérebro possui certa 'plasticidade' que varia de acordo com a idade. Quanto mais avançada a idade, menor a capacidade de ocorrerem alterações. Por isso, considera-se a memória como importante marcador biológico para o envelhecimento. Além de Võikar *et al.* (2005), outros trabalhos corroboram com o nosso dado encontrado a respeito do prejuízo da memória encontrado em animais isolados (Almeida-santos *et al.*, 2019; Zorzo *et al.*, 2019), porém, ainda não se sabe exatamente como o isolamento social afeta tão negativamente a memória. A provável direção das futuras pesquisas será a respeito do estudo do hipocampo, visto que é a principal área encefálica relacionada à regulação da memória (OPITZ, 2014). Indo nessa direção, um estudo realizado por Pereda-Pérez *et al.* (2013), constataram que seis meses de isolamento em roedores fêmeas causou um encurtamento na área CA1 do hipocampo, além de prejuízos cognitivos.

Em relação ao labirinto em cruz elevada, apesar de não encontrarmos diferenças entre os animais do grupo social e isolado, pudemos identificar que tanto o número de entradas quanto o tempo de permanência dos animais foram maiores nos braços fechados, independentemente do tipo de alojamento. Isso ocorre devido ao típico evento de "conflito de aproximação-esquiva" do animal avaliado diante de um ambiente desconhecido somado à tendência natural de esquiva em relação às regiões abertas, potencialmente perigosas e conflituosas (PINTO *et al.*, 2011).

A ingestão alimentar, glicemia de jejum e ipITT também não apresentaram diferenças entre o tipo de alojamento. Porém, foi observada uma tendência ao ganho de peso do grupo isolado em relação ao grupo social ($p=0,055$). Este achado já era esperado visto que animais isolados de forma crônica apresentam exacerbado ganho de peso (Pereda-Pérez *et al.*, 2013), assim como animais mantidos em períodos mais curtos de isolamento (Nonogaki *et al.*, 2007), reforçando os prejuízos da falta de interação social sobre a manutenção da massa corporal em roedores.

Quanto aos parâmetros da locomoção dos camundongos, pudemos identificar um aumento da velocidade média e da distância percorrida pelos animais do grupo isolado quando comparados ao grupo social. É importante reforçarmos que apesar

desse aumento na distância e na velocidade média, essa mudança na atividade não foi devido ao aumento de comportamento do tipo ansioso, visto que não observamos diferença entre os grupos durante o teste do labirinto em cruz elevado. Não descartamos, contudo, a possibilidade dos animais do grupo isolado terem apresentado um comportamento do tipo pânico durante o teste, justificando assim o aumento da locomoção. A incorporação de testes que visam identificar esse tipo de comportamento será útil nos próximos trabalhos do nosso grupo de pesquisa.

Curiosamente, nossos achados à respeito da locomoção vão contra os resultados encontrados em humanos, uma vez que Schrempft *et al.* (2019), recentemente demonstraram que idosos isolados passam mais tempo em comportamentos sedentários do que idosos mais sociáveis. Acreditamos que os resultados sejam conflitantes porque a maioria dos humanos com idade mais avançadas já apresentam algum tipo de problema de saúde antes mesmo de entrar na meia idade (Chatterjiet *al.*, 2015) e, por conta destes prejuízos, sejam físicos ou comportamentais – à título de exemplo aumento dos sintomas relacionados a depressão -, acabam isolando-se mais e afetando negativamente a locomoção. Já em camundongos, mesmo na meia idade, ainda não são encontrados prejuízos no sistema musculoesquelético (BENFATO *et al.*, 2017).

Stephoe *et al.* (2013), descobriram que tanto o isolamento social quanto a solidão predizem mortalidade acima de 7 anos de seguimento. Uma das preocupações em todos os estudos observacionais é a causalidade reversa; isto é, que o isolamento social pode ser mais comum em pessoas que estão gravemente doentes e que a mortalidade é maior por causa da maior proporção de doenças, não por causa do isolamento social (STEPTOE *et al.*, 2013). No nosso trabalho atenuamos essa variável por todo o estudo ser conduzido de forma experimental e extremamente controlada.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concluimos que o isolamento social pode aumentar algumas variáveis locomotoras embora não se apresentem em decorrência do aumento do comportamento do tipo ansioso. Durante o período experimental, houve também uma tendência ao maior ganho de peso nos animais do grupo isolado. Além disso, o isolamento social resultou em prejuízos significativos na memória de curto prazo. Tendo em vista que a memória é considerada um dos mais importantes marcadores biológicos no envelhecimento e que o isolamento social tem impacto deletério sobre essa variável,

estudos à cerca das áreas cerebrais envolvidas na capacidade de adquirir, armazenar e recuperar informações disponíveis, como o hipocampo, devem ser desenvolvidos com o objetivo de elucidar mecanismos celulares e fisiológicos ainda desconhecidos nesse modelo experimental.

8. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-SANTOS, A. F. *et al.* Social isolation impairs the persistence of social recognition memory by disturbing the glutamatergic tonus and the olfactory bulb-dorsal hippocampus coupling. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 473, 2019.
- AZEREDO, Z. A. S.; AFONSO, M. A. N. Solidão na perspectiva do idoso. **Revista Brasileira de geriatria e gerontologia**. Rio de Janeiro, v. 19, n. 2, p. 313-324, 2016.
- BASSUK, S.S.; GLASS, T.A.; BERKMAN, L.F. Social disengagement and incident cognitive decline in community-dwelling elderly persons. **Annals of Internal Medicine**, v.131, n.3, p.165-173, 1999.
- BENFATO, I.D.; MORETTO, T.L.; CARVALHO, F.P. Spontaneous physical activity and mediators of energy homeostasis in the hypothalamus of mice from 4 to 10 months of age. **Experimental Physiology**, v.102, n.11, p.1524-1534, 2017.
- CASPERSEN, C.J; PEREIRA, M.A; CURRAN, K.M. Changes in physical activity patterns in the United States, by sex and cross-sectional age. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v.32, n.9, p.1601-1609, 2000.
- CASPI, A. *et al.* Socially isolated children 20 years later: risk of cardiovascular disease. **Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine**, v.160, n.8, p.805-811, 2006.
- CHATTERJI, S. *et al.* Health, functioning, and disability in older adults-present status and future implications. **Lancet**, v. 385, n. 9967, p. 563-75, 2015.
- CHOU, K.L.; LIANG, K.; SAREEN, J. The association between social isolation and DSM-IV mood, anxiety, and substance use disorders: wave 2 of the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. **Journal of Clinical Psychiatry**, v.72, n.11, p.1468-1476, 2011.
- CORNWELL, B.; LAUMANN, E. O.; SCHUMM, L.P. The Social Connectedness of Older Adults: A National Profile. **American Sociological Review**, v.73, n.2, p.185-203, 2008.
- DOMINGUES-CASTRO, M. S.; TORRES, A. R. Hikikomori: revisão sobre um grave problema de isolamento social. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**. Rio de Janeiro, v. 67, n. 4, p. 264-272, 2018.
- HAMASAKI, H. *et al.* Correlations of non-exercise activity thermogenesis to metabolic parameters in Japanese patients with type 2 diabetes. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v.5, n.1, p.26, 2013.

ILIFFE, S.*et al.* Health risk appraisal in older people 2: the implications for clinicians and commissioners of social isolation risk in older people. **British Journal of General Practice**, v.57, n.537, p.277-282, 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Síntese de indicadores sociais. Uma análise das condições de vida da população brasileira. Rio de Janeiro, 2016.

KAMAL, A. *et al.* Social isolation stress reduces hippocampal long-term potentiation: effect of animal strain and involvement of glucocorticoid receptors. **Neuroscience**, v.3, n.256, p.262-270, 2014.

KERR, J.; ANDERSON, C.; LIPPMAN, S.M.; Physical activity, sedentary behaviour, diet, and cancer: an update and emerging new evidence. **The Lancet Oncology**, v.18, n.8, p.457-471, 2017.

MATTHEWS, J. N. *et al.* Analysis of serial measurements in medical research. **BMJ**, v. 300, n. 6719, p. 230-5, 1990.

MICHALAKIS, K. *et al.* Obesity in the ageing man. **Metabolism**, v.62, n.10, p.1341-1349, 2013.

NONOGAKI, K.; NOZUE, K.; OKA, Y. Social isolation affects the development of obesity and type 2 diabetes in mice. **Endocrinology**, v.148, n.10, p.4658-4666, 2007.

OPITZ, B. Memory function and the hippocampus. **Frontiers Neurology Neuroscience**, v. 34, p. 51-9, 2014.

OWEN, N. *et al.* Too much sitting: the population health science of sedentary behavior. **Exercise and Sport Sciences Review**, v.38, n.3, p.105-113, 2010.

PEREDA-PÉREZ, I. *et al.* Long-term social isolation in the adulthood results in CA1 shrinkage and cognitive impairment. **Neurobiology of Learning Memory**, v. 106, p. 31-9, 2013.

PINTO, W. B. V. R. *et al.* Teste de labirinto em cruz elevado: Aplicações e contribuições no estudo de doenças neuropsiquiátricas em modelos animais. **RESBCAL**, São Paulo, v.1, n.1, p. 102-120, 2012.

SCHREMPFT, S. *et al.* Associations between social isolation, loneliness, and objective physical activity in older men and women. **BMC Public Health**, v. 19, n. 1, p. 74, 2019.

SHANKAR, A. *et al.* Loneliness, Social Isolation, and Behavioral and Biological Health Indicators in Older Adults. **Health Psychology Journal**, v. 30, n. 4, p. 377-385, 2011.

- SOARES, E. Memória e envelhecimento: aspectos neuropsicológicos e estratégias preventivas. Departamento de Psicologia da Educação da Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2006.
- STEPTOE, A. *et al.* Social isolation, loneliness, and all-cause mortality in older men and women. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.110, n.15, p.5797-5801, 2013.
- UN. Department of Economic and Social Affairs Population Division; World Population Prospects, key findings & advance tables; 2017 revision.
- VILLABLANCA, P. *et al.* Nonexercise Activity Thermogenesis in Obesity Management. **Mayo Clinic Proceedings**, v.90, n.4, p.509-519, 2015.
- VÕIKAR, V. *et al.* Long-term individual housing in C57BL/6J and DBA/2 mice: assessment of behavioral consequences. **Genes, Brain and Behavior**, v.4, n.4, p.240-252, 2005.
- WHITE, C. N.; VANDERDRIFT, L. E.; HEFFERNAN, K. S. Social isolation, cognitive decline and cardiovascular disease risk. **Current Opinion in Psychology**, v.5, n.1, p.18-23, 2015.
- WU, S. H. *et al.* Non exercise physical activity and inflammatory and oxidative stress markers in women. **Journal of Women's Health**, v.23, n.2, p.159-167, 2014.
- ZORZO, C. *et al.* Adult social isolation leads to anxiety and spatial memory impairment: Brain activity pattern of COx and c-Fos. **Behavioural Brain Research**, v. 365, p. 170-177, 2019.

9. ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Controle central da atividade física espontânea em camundongos submetidos ou não à restrição calórica durante o envelhecimento.", protocolada sob o CEUA nº 5541040218 (ID 006890), sob a responsabilidade de **Izabelle Dias Benfato e equipe; Camila Aparecida Machado de Oliveira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 03/04/2018.

We certify that the proposal "Central control of spontaneous physical activity in mice submitted or not to caloric restriction during aging.", utilizing 30 isogenics mice (30 males), protocol number CEUA 5541040218 (ID 006890), under the responsibility of **Izabelle Dias Benfato and team; Camila Aparecida Machado de Oliveira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 04/03/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **03/2018 a 03/2020** Área: **Biociências**

Origem: **Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia - CEDEME**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Machos**

Idade: **3 a 4 meses**

N: **30**

Linhagem: **c57bl6**

Peso: **20 a 25 g**

Local do experimento: **Laboratório de Diabetes Experimental e Sinalização Celular da Universidade Federal de São Paulo**

São Paulo, 11 de novembro de 2019

Profa. Dra. Monica Levy Andersen
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Daniela Santoro Rosa
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo



Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 26 de abril de 2018
CEUA N 5541040218

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Izabelle Dias Benfato
Área: Biociências

Título da proposta: "Controle central da atividade física espontânea em camundongos submetidos ou não à restrição calórica durante o envelhecimento".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP (ID 003599)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 19/abril/2018) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Por meio desta emenda, gostaríamos de solicitar um acréscimo do nosso número amostral de camundongos C57bl6. Após avaliação do projeto pela Fapesp e da banca avaliadora do exame de ingresso de Doutorado da pesquisadora responsável, foi fortemente recomendado por ambos, uma inclusão de um grupo que tenha sido submetido agudamente a restrição calórica (cerca de 30 dias). Esse seria um controle fundamental, porque nos permitirá determinar se alguns dos parâmetros medidos e associados à alteração da atividade física com o envelhecimento também podem ser afetados independentemente pela restrição calórica. Por conta da inclusão deste novo grupo, seriam necessários mais dez (10) camundongos. Todos os camundongos desse grupo passarão exatamente e exclusivamente pelas mesmas avaliações e forma de eutanásia já aprovadas pelo CEUA em nossa projeto original. A banca de ingresso no Doutorado também preocupou-se com a questão do isolamento social, na qual os animais serão submetidos, por conta do regime de restrição calórica. Sendo assim, foi sugerido um grupo Envelhecido Controle Coletivo (dos 4 aos 10 meses de vida), que tenha permanecido durante todo o período experimental em gaiolas coletivas. Esse grupo tem como objetivo controlar o fator isolamento social, nos permitindo afirmar que qualquer mudança na atividade física seja causada pelo envelhecimento ou pela restrição calórica, e não por mudanças causadas por eventuais comportamentos de ansiedade e depressão. Esse é, portanto, um outro controle de qualidade fundamental do estudo. Para tanto, precisamos de mais 10 camundongos. Esses animais serão submetidos a testes comportamentais de ansiedade e depressão (descritos no documento anexo) ao final do estudo. Os animais dos grupos Envelhecido Controle e Envelhecido Restrito também irão passar por estes testes. Ainda visando a otimização dos animais (conforme salientado pelo assessor da Fapesp), realizaremos também outras 2 avaliações (descritos no documento anexo) ne".

Comentário da CEUA: "APROVADO - Sr Pesquisador notificamos que sua solicitação de adição de 20 camundongos C57bl/6 foi aprovada".

Profa. Dra. Monica Levy Andersen
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Daniela Santoro Rosa
Vice-Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo